

2. METODOLOGI

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya dan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pasca Panen, Bogor. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni – September 2017.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah baskom, nampan plastik, kompor listrik, panci, pisau, cutter, gunting, penggaris, galon, aerator, cawan Petri, botol media, gelas ukur, tabung erlenmeyer, *Beaker glass*, *object glass*, *cover glass* ukuran 18 x 18 mm, pipet tetes, mikropipet, jarum ose, *cork borer*, stik L, timbangan, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pinset spatula, bunsen, korek api, mikroskop *Olympus*, *handspayer*, autoklaf *Hirayama*, *rotary shaker Memert*, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) dan *Smartphone* (Samsung J7 Prime), spektrofotometer (UV-VIS), pH meter (*Crison*), Aerator (Rambol) Rb-600.

Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi media *Yeast Pepton Dextrose* (YPD), *Potatato Dextrose Agar* (PDA), alkohol 70%, NaOCl 2%, akuades steril, spiritus, air, kertas label, kantong plastik, kapas, *alumunium foil*, plastik *wrapping*, tisu, antibiotik (*cloramphenicol*), ethanol 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, isolat khamir *S. cerevisiae*, isolat *Fusarium* sp, Potasium Fosfat (KH_2PO_4), dan air kelapa.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian dilakukan secara 2 tahap dengan menggunakan metode eksperimental, yaitu :

1. Perbanyakan khamir *S. cerevisiae* pada 6 media air kelapa dengan penambahan potassium fosfat (KH_2PO_4), yaitu 0,125%, 0,25%, 0,375%, 0,5% dan 0,625% dan tanpa penambahan potassium fosfat (KH_2PO_4) sebagai kontrol dengan 4 kali ulangan. Data – data yang diambil meliputi jumlah populasi khamir, suhu dan pH. Pengujian disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 1 faktor.
2. Pengujian antagonis hasil dari perbanyakan khamir diujikan dengan *Fusarium* sp. secara *in vitro*. Pengujian disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan. Masing-masing diulang sebanyak

3 ulangan. Data yang diambil adalah taraf hambatan relatif *Fusarium* sp. setelah kedua isolat di inokulasikan pada media PDA.

Tabel 1. Media Perlakuan *S. cerevisiae*

Kode	Perlakuan
A1	Media air kelapa + 0,125% KH_2PO_4
A2	Media air kelapa + 0,25% KH_2PO_4
A3	Media air kelapa + 0,375% KH_2PO_4
A4	Media air kelapa + 0,5% KH_2PO_4
A5	Media air kelapa + 0,625% KH_2PO_4
A0 (Kontrol)	Media air kelapa + 0% KH_2PO_4

Keterangan ; A = penggunaan air kelapa sebagai media pertumbuhan khamir,
0-5 = Penggunaan fosfat (KH_2PO_4)

3.4 Persiapan Penelitian

3.4.1 Perbanyakkan *S. cerevisiae* pada Berbagai Media

1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat menggunakan autoklaf dan alkohol 70%. Alat-alat yang disterilisasi dengan menggunakan autoklaf adalah alat-alat yang tahan pada suhu 121°C dan tekanan 15 atm selama 120 menit sedangkan alat-alat yang tidak tahan panas disterilkan dengan menggunakan *chlorox*, alkohol 70% dan akuades.

2. *S. cerevisiae* dan Media Pertumbuhan

S. cerevisiae yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari ragi tape. Khamir tersebut dipurifikasi pada media YPD cair. *Pre-culture* dilakukan pada media YPD cair (1 g/ml *yeast extract*, 2 g/ml pepton, 2 g/ml glukosa) untuk persiapan inokulum. Pertumbuhan *S. cerevisiae* pada media padat menggunakan media YPD untuk diamati secara makroskopis dan mikroskopis.

3. Isolasi, Purifikasi dan Identifikasi *S. cerevisiae*

S. cerevisiae diisolasi dari ragi tape yang diperoleh dari pasar Dinoyo, Malang. Langkah awal melakukan isolasi khamir ialah pertama siapkan ragi sebanyak 10 gr, kemudian tempatkan dalam tabung Erlenmeyer yang berisi akuades steril sebanyak 50 ml. Dihomogenkan pada *rotary shaker* selama 2 jam pada suhu kamar. Hasil tersebut dibuat seri pengenceran 10^5 - 10^6 . Sebanyak 0,1 ml suspensi hasil pengenceran ditumbuhkan secara taburan pada media YPD

(*Yeast Peptone Dextrose*) yang mengandung 5 g/l chloramphenicol. Biakan kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 3 hari. Isolat khamir dengan koloni yang tumbuh dipindah ke media YPD yang masih segar (McCormark *et al.*, 1994). Isolat khamir kemudian dimurnikan dengan mengacu pada metode penggoresan Talukder *et al.* (2016) memindahkan koloni secara berulang ke media YPD agar hingga menjadi isolat murni dengan cara digoreskan pada media agar menggunakan jarum ose, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. Proses identifikasi secara makroskopis dilakukan dengan mengamati koloni yang tumbuh pada media agar meliputi tekstur, warna, permukaan, elevasi, dan tepi koloni. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan terhadap bentuk sel, tipe pertunasan, dan ukuran sel.

4. Pembuatan Media perbanyak S. cerevisiae

Pembuatan media pertumbuhan khamir dengan menggunakan bahan air kelapa yang diperkaya dengan penambahan nutrisi berupa Potassium Fosfat (KH_2PO_4) mengacu pada Purwitasari (2004) pembuatan media pada perlakuan yaitu air kelapa dimasukkan ke dalam botol berukuran 250 ml dan ditambahkan KH_2PO_4 dengan konsentrasi yang berbeda kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm untuk menghilangkan kontaminasi mikroorganisme yang tidak diinginkan. Sedangkan untuk pembuatan media kontrol air kelapa tidak ditambahkan KH_2PO_4 .

3.4.2 Uji antagonis S. cerevisiae terhadap Fusarium sp.

1. Pembuatan Media PDA

Media yang digunakan untuk pengujian antagonis khamir terhadap jamur patogen mengacu pada Nurlala *et al.* (2016). Jamur patogen dan khamir ditumbuhkan pada media PDA. Media PDA merupakan media yang umum digunakan untuk isolasi patogen maupun agens hayati, Dalam pembuatan 1000 ml PDA diperlukan 40 g/l PDA *powder*, 1000 ml akuades. Langkah pertama untuk membuat media PDA yaitu timbang PDA *powder* sebanyak 40 gr kemudian masukan kedalam erlenmayer yang sudah berisi akuades sebanyak 100 ml, tutup erlenmayer dengan aluminium foil dan *plastic wrapping*, selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm untuk menghilangkan kontaminasi mikroorganisme yang tidak diinginkan.

2. Isolasi, Purifikasi dan Identifikasi *Fusarium* sp.

Jamur patogen diisolasi dari tanaman budidaya yang memiliki gejala penyakit layu fusarium. Metode inokulasi mengacu pada Muhibuddin *et al.*, (2011) dalam Shofiana (2015) sampel dipotong ± 1 cm dan dicuci menggunakan NaOCl selama 1 menit kemudian dicuci menggunakan alkohol selama 1 menit. Setelah itu, sampel dibersihkan menggunakan air dan dikeringanginkan pada tisu steril. Setelah kering, potongan sampel ditanam pada media PDA didalam cawan petri. Selanjutnya isolat diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu ruang. Setelah melalui tahap inkubasi, selanjutnya purifikasi dilakukan dengan mengambil kultur dan biakan lagi dalam media PDA hingga menjadi kultur murni. Cara melakukan purifikasi mengacu pada metode Shofiana (2015) yaitu jamur yang telah diisolasi diambil dan dipisahkan kedalam media PDA baru dengan menggunakan jarum ose.

Identifikasi jamur *Fusarium* sp. dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi dengan mengamati makroskopis meliputi pengamatan morfologi koloni seperti pertumbuhan jamur pada cawan Petri, tekstur koloni, warna koloni, dan pola sebaran. Pengamatan mikroskopis dengan cara melihat hifa, warna hifa, bentuk hifa, bentuk konidia, dan ukuran spora menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian meliputi inokulasi isolat pada media perlakuan, uji pertumbuhan *S. cerevisiae* dengan penambahan fosfat KH_2PO_4 , uji pertumbuhan *S. cerevisiae* dengan Metode Aerator dan uji antagonis khamir dengan patogen. (Lampiran 21).

3.5.1 Uji Pertumbuhan *S. cerevisiae*

1. Inokulasi Isolat pada Media Perlakuan

S. cerevisiae yang telah tumbuh pada media agar YPD kemudian diinokulasikan sebanyak satu ose pada media YPD cair dengan ketentuan yeast extract sebanyak 2 g, pepton 4 g, dekstrosa 20 g, dan akuades 200 ml. Tahapan inokulasi mengacu pada metode Suprayogi *et al.* (2015) dan Purwitasari (2004). Inokulasi dilakukan dengan cara menyiapkan media cair yang telah disterilisasi sebanyak 200 ml, lalu inokulasi isolat yang diambil dari biakan koloni menggunakan jarum ose kedalam tabung reaksi kemudian diinkubasi selama 24 jam menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 160 rpm. Setelah itu khamir

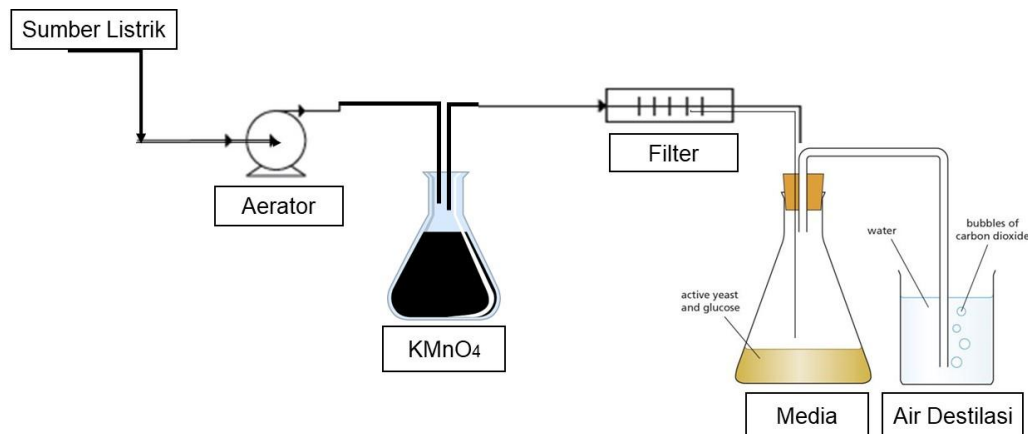
yang telah tumbuh pada media YPD cair dilakukan penyamaan massa ($OD=1$), selanjutnya inokulasikan khamir sebanyak 1 ml ke setiap media perbanyakan yang diperkaya KH_2PO_4 .

2. Uji Pertumbuhan *S. cerevisiae* dengan Penambahan Fosfat KH_2PO_4

Uji pertumbuhan *S.cerevisiae* pada media air kelapa dengan penambahan nutrisi fosfat berdasarkan metode Purwitasari (2004) dengan beberapa modifikasi, pengujian dilakukan dengan menumbuhkan khamir pada media perlakuan yang telah dibuat sebelumnya. khamir yang telah ditumbuhkan pada media YPD cair dilakukan penyamaan massa ($OD=1$), selanjutnya inokulasi khamir sebanyak 1 ml ke setiap media perlakuan yang telah ditambahkan nutrisi fosfat (KH_2PO_4) didalam botol berukuran 250ml yang sudah disterilkan dengan autoklaf pada suhu $121^{\circ}C$ dan tekanan 1 atm, kemudian tutup botol tersebut dengan alumunium foil dan plastik *wrapping*, Setelah itu diinkubasi diatas *rotary shaker* pada suhu ruang. Kemudian media tersebut diukur pH, suhu dan dihitung kerapatan populasi *S.cerevisiae* setiap 24 jam selama 4 hari.

3. Uji Pertumbuhan *S. cerevisiae* dengan Metode Aerator

Uji pertumbuhan *S. cerevisiae* dengan metode aerator ini mengacu pada penelitian Rahim (2009) yang bertujuan sebagai validasi dari uji pertumbuhan sebelumnya. Pengujian ini menggunakan media dengan nilai kerapatan tertinggi pada pengujian sebelumnya, inokulum *S. cerevisiae* dengan nilai OD tertinggi, $KMnO_4$ (1%) dan fermentor yang telah diset, media dimasukkan ke dalam tabung erlenmayer 1000 ml sebanyak 500 ml dengan dialiri udara menggunakan aerator melalui fermentor yang sudah diset sebelumnya, selanjutnya biarkan hingga kurang lebih 15 menit. Masukkan inokulum *S. cerevisiae* dengan nilai OD tertinggi kedalam media sebanyak 3 ml, kemudian udara dialiri kembali pada media tersebut. Pemasangan aerator dilakukan sampai kurang lebih 4 hari dan setiap harinya diamati jumlah kerapatan populasinya. Pengukuran jumlah kerapatan populasi menggunakan spektrofotometer. Pengukuran ini dilakukan dengan mengukur nilai OD (*Optical Density*) dengan mengambil contoh substrat.



Gambar 7. Skema Perbanyakan Aerator (Rahim, 2009)

3.5.2 Uji Antagonis Khamir

1. Inokulasi isolat khamir hasil uji pertumbuhan pada media PDA untuk uji antagonis

Saccharomyces cerevisiae yang telah diuji pertumbuhan pada media perlakuan ditumbuhkan pada media PDA untuk persiapan uji antagonis. Metode ini mengacu pada penelitian Agustining (2012) setiap khamir yang telah selesai pada uji pertumbuhan media air kelapa dengan penambahan nutrisi fosfat ditumbuhkan pada media PDA dengan cara digoreskan. Kemudian diinkubasi selama 3 hari hingga terlihat koloni tunggalnya. Koloni tunggal inilah yang digunakan dalam uji antagonis terhadap patogen *Fusarium* sp.

2. Uji Antagonis *S. cerevisiae* dengan *Fusarium* sp.

Uji antagonis isolat *S. cerevisiae* dengan jamur *Fusarium* sp. menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 1 kontrol yang diulang sebanyak 3 kali. Metode pengujian merujuk pada penelitian Shofiana (2015) pengujian antagonis isolat khamir *S. cerevisiae* dengan *Fusarium* sp. secara *in vitro*. *S. cerevisiae* yang diujikan merupakan hasil perbanyakan dengan penambahan fosfat. Kontrol disiapkan sebagai pembanding. Pengujian isolat *S. cerevisiae* yang diperoleh dilakukan dengan cara menggoreskan *S. cerevisiae* pada media PDA tepat ditengah petridis berdiameter 9 cm dengan posisi tegak lurus. Kemudian biakan *Fusarium* sp. diambil dengan *cork borer* dan diletakkan pada sisi kanan dan kiri goresan khamir dengan jarak \pm 3 cm. kemudian diinkubasi pada suhu kamar dan diamati selama 7 hari dengan cara mengukur lebar zona hambat khamir terhadap *Fusarium* sp. pada setiap harinya.

3. Prepararasi Sampel Pengamatan Mekanisme Antagonis dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM)

Scanning Electron Microscope (SEM) merupakan mikroskop yang digunakan untuk melihat interaksi mekanisme antagonis *S. cerevisiae* dengan *Fusarium* sp. Metode yang digunakan mengacu pada Hastuti (2016) yaitu hasil uji antagonis dipreparasi terlebih dahulu dengan cara menyiapkan *cover glass* steril dan diletakkan pada cawan steril-, Lalu mengiris 2 x 2 mm pada zona antagonis dan diletakkan diatas *cover glass* steril yang telah disiapkan. Kemudian dilakukan pengeringan atau dehidrasi bertingkat menggunakan konsentrasi larutan etanol 30%, 50%, 70%, 80%, 90% dan 96% dengan cara disemprotkan kurang lebih dengan jarak 30 cm. Setiap penyemprotan konsentrasi etanol dilakukan dengan jarak waktu 5 menit untuk pengeringan. Setelah isolat dikeringkan kurang lebih selama 4-5 hari, kemudian diletakkan pada alat pemegang spesimen (aluminium stub) dengan perekat koloid pasta perak dan dilapisi logam emas (Au) (ketebalan logam 15 nm) dengan mengikuti proses evaporasi. selanjutnya diamati menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM).

3.6 Variabel Pengamatan

3.6.1 Perbanyakkan *S. cerevisiae*

1. Jumlah kerapatan Populasi

Pengukuran jumlah kerapatan populasi menggunakan spektrofotometer. Pengukuran ini dilakukan dengan mengukur nilai OD (*Optical Density*) dengan mengambil contoh substrat dan blanko. Contoh substrat dan blanko yang digunakan harus dihomogenkan terlebih dahulu menggunakan vortex, kemudian dilakukan perhitungan setiap 24 jam sekali dengan masing-masing sebanyak 1ml selama 4 hari pengamatan. Perhitungan sel mengacu pada Sholikhah *et al.* (2012) jumlah sel yang dihitung menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 600 nm.

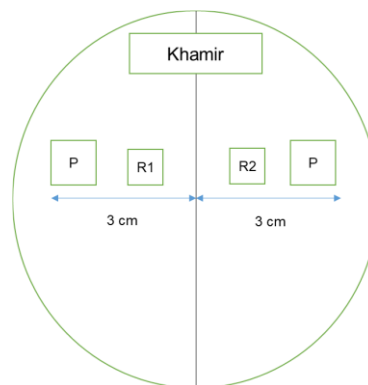
2. Suhu dan pH

Pengukuran pH dan suhu dilakukan setelah perhitungan kerapatan populasi khamir *S. cerevisiae*, untuk perhitungan pH menggunakan pHmeter dan untuk perhitungan suhu menggunakan thermometer. Perhitungan pH ini merujuk pada penelitian Purwitasari *et al.* (2004) Pengukuran pH dilakukan pada 24 jam selama 4 hari dengan menggunakan pH meter.

3.6.2 Uji Antagonis

1. Persentase Tingkat Hambatan Relatif

Persentase tingkat hambatan relatif terhadap patogen dihitung selama 7 hari dengan cara mengukur lebar zona hambat khamir terhadap *Fusarium* sp. pada setiap harinya. Persentase tingkat hambatan relative dihitung dengan rumus yang mengacu pada Begum *et al.* (2008) yaitu:



Gambar 8. Peta uji antagonis khamir dengan patogen

$$THR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100\%$$

Keterangan:

THR : presentase tingkat hambatan terhadap pertumbuhan patogen

R1 : jumlah jari-jari (R1 + R2) koloni patogen tanpa perlakuan khamir (kontrol)

R2 : jumlah jari-jari (R1 + R2) koloni patogen yang diberi perlakuan khamir

2. Pengamatan Mekanisme Antagonis dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM)

Mekanisme yang terjadi pada isolat khamir dengan patogen kemudian akan diamati secara lebih detail dengan menggunakan *Scanning Elektron Microscope* (SEM). Pengamatan dilakukan secara visual terhadap hasil fotomikrograf. Cara kerja SEM adalah gelombang elektron yang dipancarkan *electron gun* terkondensasi di lensa kondensor dan terfokus sebagai titik yang jelas oleh lensa objektif. *Scanning coil* yang diberi energi menyediakan medan magnetik bagi sinar elektron. Berkas sinar elektron yang mengenal cuplikan menghasilkan elektron sekunder dan kemudian dikumpulkan oleh detektor sekunder atau detektor backscatter (Gunawan, 2010).

3.7 Analisis data

Data yang diperoleh dari uji pertumbuhan *S. cerevisiae* dengan penambahan fosfat (KH_2PO_4) dan uji antagonis *S. cerevisiae* dengan patogen *Fusarium sp.* dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (Anova) dan apabila terdapat nilai yang berbeda nyata dilanjutkan dengan uji perbandingan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf kesalahan 5% dengan menggunakan software *Microsoft Excel* 2013 dibantu dengan program DSAASTAT versi 1.101.